# 瘤胃保护性色氨酸饲粮中添加亚叶酸钙对绵羊血浆色氨酸、犬尿氨酸和褪黑素含量的影响

王 根 陈 晖 赵 芳 高 超 赵国栋 李晓斌 马 晨 杨开伦*

（新疆农业大学动物科学学院，新疆肉乳用草食动物营养重点实验室，乌鲁木齐 830052）

**摘 要**：本试验研究在瘤胃保护性色氨酸（RPTrp）的饲粮中添加 2 种剂量的亚叶酸钙（CF）对绵羊血浆色氨酸（Trp）、犬尿氨酸（Kyn）和褪黑素（MT）含量的影响，旨在探究调控反刍动物体内 MT 合成的方法。试验选取（3.0±0.5）岁、平均体重（64.45±3.48） kg 健康的萨福克绵羊 15 只，按体重分为 3 组，每组 5 只，分别为对照组和试验Ⅰ、Ⅱ组。每天每只羊精料补充料饲喂量为 12 g/kg BW，玉米青贮为 1.8 kg，RPTrp 为 222.2 mg/kg BW，自由采食混合干草，在此基础上，试验Ⅰ组添加 50 mg 的 CF、试验Ⅱ组添加 100 mg 的 CF，进行 15 d 的饲养试验。结果表明：1）上午饲喂后 0~12 h 期间，各组间血浆 Trp、Kyn 含量差异均不显著（$P>0.05$）；在 6、8 h 时，试验组血浆 Trp 含量有降低的趋势（$P$=0.087 2、$P$=0.053 1）；在 4.5、6、8、10 h 时，试验组血浆 Kyn 含量也有降低的趋势（$P$=0.094 8、$P$=0.066 7、$P$=0.090 9、$P$=0.054 2）。2）上午饲喂后 4.5、8 h 时，试验组血浆 5-羟色胺（5-HT）含量与对照组相比有增加的趋势（$P$=0.080 7、$P$=0.054 1），在 10 h 时，试验组极显著升高（$P$=0.005 7）；上午饲喂后 6、8 h 时，试验组 MT 含量也有增加的趋势（$P$=0.089 0、$P$=0.070 4），10 h 时极显著高于对照组（$P$=0.000 2）。3）上午饲喂前 0 h，与对照组相比，试验Ⅱ组血浆总抗氧化能力、谷胱甘肽过氧化物酶活性均显著提高（$P<0.05$），丙二醛含量显著降低（$P<0.05$），试验Ⅰ组血浆总抗氧化能力也显著提高（$P<0.05$）。因此，每天每只绵羊饲喂 RPTrp（222.2 mg/kg·BW）饲粮基础上添加 50 或 100 mg 的 CF，在饲喂后 4.5~10 h 期间有降低血浆 Kyn 含量的趋势，对血浆 Trp、5-HT、MT 含量整体没有显著影响，但可提高绵羊血浆抗氧化能力。

关键词：绵羊；瘤胃保护性色氨酸；亚叶酸钙；犬尿氨酸；褪黑素

---

收稿日期：2018-04-07

基金项目：国家自然科学基金项目（31760681）

作者简介：王 根（1983—），男，山东菏泽人，硕士研究生，研究方向为草食动物营养代谢。E-mail: 570610080@qq.com

*通信作者：杨开伦，教授，博士生导师，E-mail: yangkailun2002@aliyun.com

中图分类号：S826 文献标识码： 文章编号：

哺乳动物体内褪黑素（melatonin，MT）是主要由松果体合成和分泌的一种吲哚类激素，广泛分布在很多器官、组织和细胞中[1-2]。研究显示，MT 可促进绵羊卵母细胞成熟[3]、维持精子功能[4]、促进胚胎发育[5]和提高机体的抗氧化能力[6]，因此适当提高血浆 MT 含量可能对绵羊生殖和机体健康具有重要的意义。色氨酸（tryptophan，Trp）作为动物体内合成 MT 的前体物质，在体内经羟化、脱羧、乙酰化和甲基化形成 MT。本实验室前期研究表明，补喂瘤胃保护性色氨酸（rumen protected tryptophan，RPTrp）可提高绵羊血浆总 Trp 和游离 Trp 含量，同时犬尿氨酸（kynurenine，Kyn）含量也升高。提高 Trp 转化为 MT 合成量首先要提高 5-羟色氨酸（5-hydroxytryptamine，5-HT）合成量，而四氢生物蝶呤（tetrahydrobiopterin，$BH_4$）是 Trp 合成 5-HT 的关键酶色氨酸羟化酶（tryptophan hydroxylase，TPH）的辅酶[7]。由于亚叶酸钙（calcium folinate，CF）是叶酸的衍生物，经吸收后可直接提供叶酸在体内的活化形式，具有稳定 $BH_4$ 的作用[8-9]。因此，本试验选择绵羊为试验动物，通过增加绵羊肠道 Trp 吸收量的同时添喂 CF，探究 CF 对降低 Trp-Kyn 代谢途径、提高 Trp 转化为 MT 是否有影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间与地点

试验于 2017 年 7 月 30 日至 2017 年 8 月 14 日在新疆惠康畜牧生物科技有限公司羊场、自然光照条件下进行。采集血样当天日出时间为 07:12，日落时间为 21:15，昼长 14.03 h。

### 1.2 试验动物

选择（3.0±0.5）岁、平均体重（64.45±3.48） kg 健康的萨福克绵羊 15 只。

### 1.3 试验设计

将 15 只萨福克绵羊随机分为 3 组，每组 5 只，分别为对照组、试验 I 组和试验 II 组。所有试验羊只饲喂同一营养水平精料补充料（购自新疆天康畜牧生物技术股份有限公司），每天每只羊精料补充料饲喂量为 12 g/kg BW、RPTrp（购自北京亚禾营养高新技术有限公司，Trp 含量≥45%，过瘤胃率≥85%）为 222.2 mg/kg BW、玉米青贮 1.8 kg，补喂量参考 Itabashi 等[10]的研究结果，自由采食混合干草（苜蓿：麦秸=1:1）和饮水，在此基础上，试验 I 组每天每只羊补喂 50 mg 的 CF（购自上海柯维化学技术有限公司），试验 II 组每天每只羊补喂

100 mg 的 CF，添加量参考 Ravaud 等[11]的研究结果。试验饲粮组成及营养水平见表 1。

表1　试验饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diets　(DM basis）　%

| 项目 Items | 对照组 Control group | 试验 I 组 Trial group I | 试验 II 组 Trial group II |
|---|---|---|---|
| 精料补充料 Concentrate supplement1) | 35.75 | 36.90 | 35.25 |
| 玉米青贮 Corn silage | 23.72 | 24.57 | 24.50 |
| 苜蓿 Alfalfa hay | 19.78 | 18.80 | 19.65 |
| 麦秸 Wheat straw | 20.75 | 19.73 | 20.60 |
| 合计 Total | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 营养水平 Nutrient levels2) | | | |
| 干物质 DM | 93.51 | 93.47 | 93.52 |
| 灰分 Ash | 9.48 | 9.44 | 9.50 |
| 粗蛋白质 CP | 13.37 | 13.51 | 13.30 |
| 中性洗涤纤维 NDF | 54.40 | 54.14 | 54.57 |
| 酸性洗涤纤维 ADF | 32.09 | 31.77 | 32.25 |
| 色氨酸 Trp | 0.15 | 0.52 | 0.50 |
| 钙 Ca | 1.06 | 1.07 | 1.05 |
| 磷 P | 0.32 | 0.32 | 0.31 |
| 合计 Total | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

1)每千克精料补充料中含有 One kg of concentrate supplement contained the following: 玉米 corn 0.44 kg，燕麦 oat 0.16 kg，大麦 barley 0.15 kg，豆粕 soybean meal 0.20 kg，磷酸氢钙 $CaHPO_4$ 0.03 kg，食盐 NaCl 0.01 kg，预混料 premix 0.01 kg。每千克预混料含有 The premix provided the following per kg of the concentrate supplement: VA 480 IU，$VB_1$ 816 mg, $VB_2$ 333 mg，$VB_6$ 49 mg，VD 70 U，VE 21 333 IU，泛酸 pantothenic acid 20 mg，烟酰胺 nicotinamide 485 mg，Cu (as copper sulfate) 11 mg，Fe (as ferrous sulfate) 35

mg，Mn (as manganese sulfate) 33 mg，Zn (as zinc sulfate) 31 mg，I (as potassium iodide) 2 mg，Se (as sodium selenite) 6 mg，Co (as cobalt chloride) 1 mg。

2)色氨酸含量为计算值，其他营养水平为实测值。The content of Trp was a calculated value, while the other nutrient levels were measured values.

### 1.4　饲养管理

试验羊只单栏位饲养，每天每只羊的 RPTrp、CF、精料补充料和青贮平均分成 2 份，分别于 08:00、20:00 饲喂。为保证补喂的 RPTrp 和 CF 采食完全，先将 RPTrp、CF 与 50 g 精料补充料混匀后饲喂，待绵羊采食完毕后再投喂剩余精料补充料、玉米青贮，自由采食干草和饮水。根据试验羊场的饲养管理规定，定期打扫圈舍。

### 1.5　样品的采集与处理

于试验的第16天采集血样，采集时间点为上午饲喂前0 h（07:30）、饲喂后1.5、3、4.5、6、8、10、12 h，通过颈静脉采集血液至肝素钠抗凝采血管中，3 500 r/min离心15 min制备血浆，分装至1.5 mL Eppendorf管中，标记后-20 ℃冰箱中冷冻保存。

### 1.6　指标的测定

高效液相色谱法测定血浆 Trp、Kyn 含量[12]。采用酶联免疫吸附法测定血浆 5-HT、MT 含量；上午饲喂前 0 h 血浆总抗氧化能力（T-AOC），谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、超氧化物歧化酶（SOD）活性和丙二醛（MDA）含量采用比色法测定，样品均送至北京华英生物技术研究所进行检测。

### 1.7　数据处理

采用 SAS 8.0 统计软件的 ANOVA 进行单因素方差分析，差异显著则用 Duncan 氏法进行多重比较。用 $P$＜0.01、$P$＜0.05 和 0.05＜$P$＜0.10 分别作为差异极显著、差异显著和有差异趋势的判断标准。

## 2　结　果

### 2.1　补喂RPTrp基础上添加CF对绵羊血浆Trp含量的影响

由表2可知，上午饲喂后0~12 h期间，各组间绵羊血浆Trp含量差异均不显著（$P$＞0.05），变化趋势基本一致；在6和8 h时，与对照组相比，试验组血浆Trp含量有降低的趋势（$P$=0.087 2、$P$=0.053 1）。

表2 补喂RPTrp基础上添加CF对绵羊血浆Trp含量的影响

Table 2 Effects of supplementation with CF on plasma Trp content in sheep fed RPTrp （$n$=5） μmol/L

| 采样时间点 Sampling time | 时间 Time | 对照组 Control group | 试验Ⅰ组 Trail group Ⅰ | 试验Ⅱ组 Trail group Ⅱ | $P$ 值 $P$-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 上午饲喂前 0 h 0 h before feeding in the morning | 07:30 | 45.46±4.87 | 40.55±4.35 | 44.96±8.24 | 0.468 0 |
| 上午饲喂后 1.5 h 1.5 h after feeding in the morning | 09:30 | 35.29±2.15 | 34.88±3.14 | 34.54±1.43 | 0.958 5 |
| 上午饲喂后 3 h 3 h after feeding in the morning | 11:00 | 37.46±2.05 | 33.42±1.95 | 35.44±6.00 | 0.433 6 |
| 上午饲喂后 4.5 h 4.5 h after feeding in the morning | 12:30 | 43.84±2.48 | 36.26±6.02 | 37.70±8.69 | 0.395 2 |
| 上午饲喂后 6 h 6 h after feeding in the morning | 14:00 | 47.38±4.37 | 39.04±4.39 | 42.42±4.21 | 0.087 2 |
| 上午饲喂后 8 h 8 h after feeding in the morning | 16:00 | 47.77±3.74 | 41.03±4.76 | 44.22±3.94 | 0.053 1 |
| 上午饲喂后 10 h 10 h after feeding in the morning | 18:00 | 46.99±3.60 | 40.35±3.88 | 43.89±4.23 | 0.111 1 |
| 上午饲喂后 12 h 12 h after feeding in the morning | 20:00 | 43.74±3.50 | 41.84±5.03 | 40.92±2.62 | 0.336 1 |

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著（$P$＞0.05），不同小写字母表示差异显著（$P$＜0.05），不同大写字母表示差异极显著（$P$＜0.01）。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant different ($P$＞0.05), while with different small letter superscripts mean significant different ($P$<0.05), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P$<0.01). The same as below.

2.2　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 Kyn 含量的影响

由表 3 可知，上午饲喂后 0~12 h 期间，各组绵羊血浆 Kyn 含量无显著性差异（$P$>0.05），其中在 4.5~10 h 期间，与对照组相比，试验组血浆 Kyn 含量有降低的趋势（$P$=0.094 8、$P$=0.066 7、$P$=0.090 9、$P$=0.054 2）。

表 3　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 Kyn 含量的影响

Table 3　Effect of supplementation with CF on plasma Kyn content in sheep fed RPTrp （$n$=5）　μmol/L

| 采样时间点 Sampling time | 时间 Time | 对照组 Control group | 试验 I 组 Trail group I | 试验 II 组 Trail group II | $P$ 值 $P$-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 上午饲喂前 0 h 0 h before feeding in the morning | 07:30 | 4.89±0.42 | 4.46±0.61 | 4.02±0.15 | 0.188 0 |
| 上午饲喂后 1.5 h 1.5 h after feeding in the morning | 09:30 | 4.00±0.66 | 3.59±0.59 | 3.91±0.78 | 0.669 5 |
| 上午饲喂后 3 h 3 h after feeding in the morning | 11:00 | 3.82±0.87 | 3.43±0.62 | 3.81±0.87 | 0.667 1 |
| 上午饲喂后 4.5 h 4.5 h after feeding in the morning | 12:30 | 4.15±0.36 | 3.52±0.17 | 3.33±0.57 | 0.094 8 |
| 上午饲喂后 6 h 6 h after feeding in the morning | 14:00 | 4.31±0.45 | 3.96±0.28 | 3.54±0.39 | 0.066 7 |
| 上午饲喂后 8 h 8 h after feeding in the morning | 16:00 | 4.55±0.56 | 4.12±0.49 | 3.72±0.32 | 0.090 9 |
| 上午饲喂后 10 h 10 h after feeding in the morning | 18:00 | 4.40±0.43 | 4.06±0.16 | 3.66±0.32 | 0.054 2 |
| 上午饲喂后 12 h 12 h after feeding in the morning | 20:00 | 4.48±0.28 | 4.02±0.42 | 3.98±0.47 | 0.204 9 |

2.3　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 5-HT 含量的影响

由表4可知，上午饲喂后0~8 h期间，与对照组相比，试验组绵羊血浆5-HT含量均有所提高，各组间变化趋势相似，但各组间差异不显著（$P$＞0.05）；其中在4.5和8 h时，试验组血浆5-HT含量有增加的趋势（$P$=0.080 7、$P$=0.054 1）；在10 h时，试验组极显著高于对照组（$P$=0.005 7），试验组间差异不显著（$P$＞0.05）。

表 4　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 5-HT 含量的影响

Table 4　Effect of supplementation with CF on plasma 5-HT content in sheep fed RPTrp （$n$=5）　μmol/L

| 采样时间点 Sampling time | 时间 Time | 对照组 Control group | 试验Ⅰ组 Trail group Ⅰ | 试验Ⅱ组 Trail group Ⅱ | $P$ 值 $P$-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 上午饲喂前 0 h 0 h before feeding in the morning | 07:30 | 320.88±46.71 | 328.21±53.39 | 331.46±70.62 | 0.964 4 |
| 上午饲喂后 1.5 h 1.5 h after feeding in the morning | 09:30 | 223.96±76.23 | 264.24±40.32 | 255.33±49.02 | 0.708 6 |
| 上午饲喂后 3 h 3 h after feeding in the morning | 11:00 | 155.89±8.34 | 182.53±29.25 | 185.26±35.92 | 0.730 9 |
| 上午饲喂后 4.5 h 4.5 h after feeding in the morning | 12:30 | 230.35±23.38 | 279.01±33.96 | 312.57±36.78 | 0.080 7 |
| 上午饲喂后 6 h 6 h after feeding in the morning | 14:00 | 273.37±16.26 | 285.57±55.92 | 296.94±56.72 | 0.813 0 |
| 上午饲喂后 8 h 8 h after feeding in the morning | 16:00 | 179.73±11.17 | 204.53±27.72 | 230.40±15.00 | 0.054 1 |
| 上午饲喂后 10 h 10 h after feeding in the morning | 18:00 | 209.28±28.97$^{Bb}$ | 301.12±17.32$^{Aa}$ | 314.57±23.82$^{Aa}$ | 0.005 7 |
| 上午饲喂后 12 h 12 h after feeding in the morning | 20:00 | 360.46±70.45 | 319.97±64.40 | 282.47±43.54 | 0.217 0 |

2.4　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 MT 含量的影响

由表 5 可知，上午饲喂后 0~8 h 期间，各组间绵羊血浆 MT 含量差异不显著（$P$＞

0.05），但在 6 和 8 h 时，试验组 MT 含量有增加的趋势（*P*=0.089 0、*P*=0.070 4）。上午饲喂后 8~10 h 期间，对照组绵羊血浆 MT 含量呈下降趋势，10 h 时为白天含量最小值，而试验组呈上升趋势，10 h 时极显著高于对照组（*P*=0.000 2）。

表 5　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 MT 含量的影响

Table 5　Effect of supplementation with CF on plasma MT content in sheep fed RPTrp （*n*=5）　pg/mL

| 采样时间点 Sampling time | 时间 Time | 对照组 Control group | 试验 I 组 Trail group I | 试验 II 组 Trail group II | *P* 值 *P*-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 上午饲喂前 0 h 0 h before feeding in the morning | 07:30 | 73.78±3.98 | 73.58±6.99 | 75.98±4.56 | 0.462 9 |
| 上午饲喂后 1.5 h 1.5 h after feeding in the morning | 09:30 | 79.40±8.64 | 92.14±2.93 | 88.45±10.59 | 0.294 7 |
| 上午饲喂后 3 h 3 h after feeding in the morning | 11:00 | 66.00±6.25 | 59.71±2.79 | 61.05±6.90 | 0.465 9 |
| 上午饲喂后 4.5 h 4.5 h after feeding in the morning | 12:30 | 87.51±9.72 | 78.29±2.69 | 86.20±8.73 | 0.366 6 |
| 上午饲喂后 6 h 6 h after feeding in the morning | 14:00 | 45.80±1.02 | 52.82±7.16 | 56.20±6.08 | 0.089 0 |
| 上午饲喂后 8 h 8 h after feeding in the morning | 16:00 | 66.40±5.80 | 77.77±1.73 | 71.20±6.40 | 0.070 4 |
| 上午饲喂后 10 h 10 h after feeding in the morning | 18:00 | 42.36±6.98$^{Bc}$ | 81.72±10.45$^{Ab}$ | 112.88±19.28$^{Aa}$ | 0.000 2 |
| 上午饲喂后 12 h 12 h after feeding in the morning | 20:00 | 63.03±10.51 | 61.63±7.17 | 62.68±4.46 | 0.970 7 |

2.5　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆生化指标的影响

由表 6 可知，上午饲喂前 0 h，与对照组相比，试验 II 组绵羊血浆 T-AOC、GSH-Px 活

性显著提高（$P$＜0.05），MDA 含量显著降低（$P$＜0.05），试验Ⅰ组 T-AOC 也显著提高（$P$＜0.05），但试验Ⅰ组血浆 GSH-Px 活性、MDA 含量与对照组差异不显著（$P$＞0.05）。各组间血浆 SOD 活性无显著性差异（$P$＞0.05）。

表 6　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆生化指标的影响

Table 6　Effects of supplementation with CF on plasma biochemical indexes in sheep fed RPTrp （*n*=5）

| 项目<br>Items | 对照组<br>Control group | 试验Ⅰ组<br>Trail group Ⅰ | 试验Ⅱ组<br>Trail group Ⅱ | *P* 值<br>*P*-value |
|---|---|---|---|---|
| 总抗氧化能力 T-AOC/（U/mL） | 9.86±1.44[b] | 12.29±1.38[a] | 15.53±2.70[a] | 0.037 3 |
| 谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/（U/mL） | 820.61±102.01[b] | 848.78±49.60[b] | 1 054.48±93.35[a] | 0.011 7 |
| 超氧化物歧化酶 SOD/（U/mL） | 72.51±8.70 | 65.90±7.05 | 81.52±5.83 | 0.059 7 |
| 丙二醛 MDA/（nmol/mL） | 3.70±0.57[a] | 3.40±0.34[ab] | 2.78±0.43[b] | 0.023 7 |

## 3　讨　论

### 3.1　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 Trp、Kyn 含量的影响

本试验中，上午饲喂后 0~12 h 期间，各组间绵羊血浆 Trp 含量无显著性差异，但试验组均低于对照组，且在 6 和 8 h 时有降低的趋势。研究显示，CF 是叶酸的衍生物，具有稳定和促进机体 $BH_4$ 合成的作用[8]。本试验结果可能与补喂 CF 提高了绵羊体内 $BH_4$ 的含量和 TPH 的活性、促进 Trp 沿 5-HT 途径分解为 5-羟色氨酸有关。本试验中，上午饲喂后 4.5~10 h 期间，与对照组相比，试验组绵羊血浆 Kyn 含量有降低的趋势，与血浆 Trp 含量的变化趋势基本一致。研究表明，动物体内约 95% 的 *L*-Trp 在色氨酸-2,3 双加氧酶（tryptophan-2,3-dioxygenase，TDO）和吲哚胺-2,3 双加氧酶（indoleamine-2,3-dioxygenase，IDO）作用下生成 Kyn[13]。生理情况下，TDO 是肝内催化 Trp 形成 Kyn 关键酶，活性主要受底物 Trp 和激素（糖皮质激素和雌激素）水平的影响[14-15]，而 IDO 主要在机体受感染、炎症或应激时肝外组织发挥作用[16]。本试验中，补喂 CF 可能对绵羊肝内 TDO 活性无显著影响，血浆 Kyn 含量降低可能与补喂 CF 提高了绵羊体内 TPH 活性或表达量、降低血浆 Trp 含量有关。

### 3.2　补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆 5-HT、MT 含量的影响

本试验中，上午饲喂后 0~8 h 期间，试验组绵羊血浆 5-HT 含量与对照组相比无显著性升高，但在 4.5 和 8 h 时有升高的趋势。研究显示，动物体内 TPH 主要有 2 种不同基因编码的亚型 *TPH*1 和 *TPH*2。TPH1 主要分布在肠嗜铬细胞和松果体中，TPH2 主要分布于肠神经系统和中枢神经系统 5-HT 神经元中[17-19]。在中枢神经系统中，$BH_4$ 含量并不能使 TPH2 饱和，因此，直接向脑室注入 10 μL 浓度为 20 nmol/L 的 $BH_4$ 或通过微透析灌注 $BH_4$ 的类似物四氢生物蝶呤二盐酸均可显著增加小鼠脑部组织 TPH2 活性和 5-HT 含量[20-21]。能否通过提高血浆 $BH_4$ 含量进而提高 TPH1 活性和血浆 5-HT 含量还未见报道。本试验结果可能与 CF 添加量不足或在瘤胃降解有关，对 TPH1 活性无显著性影响。本试验中 CF 添加量是参考胃癌患者化疗时口服 CF 量(90 mg/d)设置[11]，目前尚未有 CF 在反刍动物瘤胃内降解的研究文献，今后的试验可通过增加 CF 补喂量或补喂瘤胃保护性 CF 进一步验证。本试验结果还可能与绵羊体内 *TPH* 表达量有关。如果 *TPH* 表达量较低，$BH_4$ 已使其饱和，通过补喂 CF 增加 $BH_4$ 含量也可能对 TPH1 活性无显著影响。研究表明，哺乳动物机体超过 95%的 5-HT 分布于胃肠道，主要有肠嗜铬细胞合成[22-23]。本试验中，上午饲喂后 10 h 时，试验组绵羊血浆 5-HT 含量极显著高于对照组，这可能与补喂 CF 促进了肠嗜铬细胞中 *TPH*1 的表达和 5-羟色氨酸合成有关。由于本试验未采集绵羊肠黏膜组织，在以后试验中可通过测定绵羊肠黏膜中 TPH1 含量进一步验证。

研究表明，TPH1 不仅是合成 5-HT 的限速酶，也是合成 MT 的关键酶[24]。在白天，哺乳动物血浆 MT 主要来于肠嗜铬细胞[25]。Namboodiri 等[26]证实，腹腔注射 20 或 200 mg/kg BW 的 5-羟色氨酸可显著提高绵羊血浆 MT 含量。本试验中，上午饲喂后 6 和 8 h 时，试验组绵羊血浆 MT 含量有增加的趋势，10 h 时极显著高于对照组。这可能与补喂 CF 增加了绵羊肠嗜铬细胞中 *TPH*1 表达量、提高了血浆 5-羟色氨酸含量有关。此外，5-HT 既是色氨酸、5-HTP 的转化产物，也是生成 MT 的前体物质。研究发现，肠嗜铬细胞、肠神经细胞、血小板、肝脏和肾脏广泛存在单胺氧化酶，可将 5-HT 转化为 5-羟吲哚乙酸，最后经尿液排出体外[23,27-28]。本试验中，上午饲喂后 4.5 h 时，试验组血浆 5-HT 含量有增加的趋势，而 MT 含量并未增加，可能与补喂 CF 增加了绵羊体内 5-羟吲哚乙酸含量有关。在今后的研究中可进一步检测绵羊血浆和尿液中 5-羟吲哚乙酸含量，验证补喂瘤胃 RPTrp 基础上添加不同剂量 CF 对绵羊血浆 5-HT 含量的影响。

### 3.3 补喂 RPTrp 基础上添加 CF 对绵羊血浆生化指标的影响

本试验中，补喂 RPTrp 基础上添加 CF 可提高绵羊血浆的抗氧化能力。研究表明，叶酸可促进 $BH_2$ 向 $BH_4$ 转化，而 $BH_4$ 具有抗氧化的功能[29]。由于 CF 可直接提供叶酸在体内的活化形式，促进 $BH_2$ 向 $BH_4$ 转化。本试验结果可能与绵羊血浆 $BH_4$ 含量升高有关。此外，本试验结果还可能与绵羊血浆 MT 含量升高有关，MT 是一种有效的抗氧化剂，可减少机体活性氧和活性氮的含量，增加抗氧化酶的表达和活性[6]。

## 4 结　论

每天每只绵羊在饲喂 RPTrp（222.2 mg/kg BW）饲粮基础上添加 50 或 100 mg 的 CF，有降低血浆 Kyn 含量的趋势，对白天血浆 Trp、5-HT、MT 含量整体没有显著影响，但可提高绵羊血浆抗氧化能力。

参考文献：

[1] SANCHEZ-HIDALGO M,DE LA LASTRA C A,CARRASCOSA-SALMORAL M P,et al.Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues[J].Experimental Gerontology,2009,44(5):328–334.

[2] KVETNOY I M.Extrapineal melatonin:location and role within diffuse neuroendocrine system[J].The Histochemical Journal,1999,31(1):1–12.

[3] 田秀芝.褪黑素和 CNP 对绵羊卵母细胞体外成熟的影响及过表达 AANAT 的研究[D].博士学位论文.北京:中国农业大学,2017.

[4] JANG H Y,KIM Y H,KIM B W,et al.Ameliorative Effects of melatonin against hydrogen peroxide - induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent *in vitro* embryo development[J].Reproduction in Domestic Animals,2010,45(6):943–950.

[5] ABECIA J A,FORCADA F,ZÚÑIGA O.The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vivo*[J].Veterinary Research Communications,2002,26(2):151–158.

[6] REITER R J,MAYO J C,TAN D X,et al.Melatonin as an antioxidant:under promises but over delivers[J].Journal of Pineal Research,2016,61(3):253–278.

[7] ROBERTS K M,FITZPATRICK P F.Mechanisms of tryptophan and tyrosine

hydroxylase[J].IUBMB Life,2013,65(4):350–357.

[8] DUCLOUX D,ABOUBAKR A,MOTTE G,et al.Hyperhomocysteinaemia therapy in haemodialysis patients:folinic versus folic acid in combination with vitamin B6 and B12[J].Nephrology Dialysis Transplantation,2002,17(5):865–870.

[9] WHITSETT J,RANGEL FILHO A,SETHUMADHAVAN S,et al.Human endothelial dihydrofolate reductase low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling[J].Free Radical Biology and Medicine,2013,63:143–150.

[10] ITABASHI H,MATSUMOTO M,KOBAYASHI T.Effects of rumen-bypass tryptophan and ethanol treatment of soyabeans on digestibility,nitrogen retention,urinary allantoin excretion and plasma free amino acids in goats[J].Bulletin of National Institute of Animal Industry,1976,54:13–20.

[11] RAVAUD A,BORNER M,SCHELLENS J H,et al.UFT and oral calcium folinate as first-line chemotherapy for metastatic gastric cancer[J].Oncology (Williston Park,N.Y.),1999,13(7 Suppl.3):61–63.

[12] 谢占武,邓上奇,刘瑞凝,等.健康牛、羊血清及牛奶中游离色氨酸的微量测定[J].中国畜禽传染病,1991(6):27–30.

[13] YAO K,FANG J,YIN Y L,et al.Tryptophan metabolism in animals:important roles in nutrition and health[J].Frontiers in Bioscience (Scholar Edition),2011,3:286–297.

[14] GBEENGARD O,FEIGELSON P.A difference between the modes of action of substrate and hormonal inducers of rat liver tryptophan pyrrolase[J].Nature,1961,190(4774):446–447.

[15] SMITH S A,POGSON C I.The metabolism of L-tryptophan by isolated rat liver cells.Effect of albumin binding and amino acid competition on oxidatin of tryptophan by tryptophan 2,3-dioxygenase[J].Biochemical Journal,1980,186(3):977–986.

[16] BALL H J,SANCHEZ-PEREZ A,WEISER S,et al.Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice[J].Gene,2007,396(1):203–213.

[17] WALTHER D J,PETER J U,BASHAMMAKH S,et al.Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform[J].Science,2003,299(5603):76.

[18] ZHANG X D,BEAULIEU J M,SOTNIKOVA T D,et al.Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis[J].Science,2004,305(5681):217.

[19] ZHANG X D,GAINETDINOV R R,BEAULIEU J M,et al.Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression[J].Neuron,2005,45(1):11–16.

[20] MIWA S,WATANABE Y,HAYAISHI O.6*R*-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin as a regulator of dopamine and serotonin biosynthesis in the rat brain[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,1985,239(1):234–241.

[21] KAPATOS G,KATOH S,KAUFMAN S.Biosynthesis of biopterin by rat brain[J].Journal of Neurochemistry,1982,39(4):1152–1162.

[22] GERSHON M D.Review article:serotonin receptors and transporters—roles in normal and abnormal gastrointestinal motility[J].Alimentary Pharmacology and Therapeutics,2004,20(Suppl.7):3–14.

[23] GERSHON M D,TACK J.The serotonin signaling system:from basic understanding to drug development for functional GI disorders[J].Gastroenterology,2007,132(1):397–414.

[24] PRIVAT K,RAVAULT J P,CHESNEAU D,et al.Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin *N*-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina[J].Journal of Pineal Research,1999,26(4):193–203.

[25] ACUÑA-CASTROVIEJO D,ESCAMES G,VENEGAS C,et al.Extrapineal melatonin:sources,regulation,and potential functions[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2014,71(16):2997–3025.

[26] NAMBOODIRI M A,SUGDEN D,KLEIN D C,et al.5-Hydroxytryptophan elevates serum melatonin[J].Science,1983,221(4611):659–661.

[27] BACH A W,LAN N C,JOHNSON D L,et al.cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B:molecular basis of differences in enzymatic properties[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1988,85(13):4934–4938.

[28] SOLE M J,MADAPALLIMATTAM A,BAINES A D.An active pathway for serotonin

synthesis by renal proximal tubules[J].Kidney International,1986,29(3):689–694.

[29] 王卓飞,陈锦文,铁璐,等.四氢生物蝶呤的合成及其生物学功能[J].生理科学进展,2015,46(4):259–264.

Effects of Supplementation with Calcium Folate on Plasma Tryptophan, Kynurenine and Melatonin Contents in Sheep Fed Rumen Protected Tryptophan

WANG Gen CHEN Hui ZHAO Fang GAO Chao ZHAO Guodong Li Xiaobin MA Chen YANG Kailun*

(*Xinjiang Agricultural University*，*Xinjiang Key Laboratory of Meat & Milk Production Herbivore Nutrition, Urumqi* 830052, *China*)

**Abstract**: The objective of this study was to explore the method of regulating the synthesis of melatonin (MT) in ruminants by detecting the effects of two doses of calcium folate (CF) on plasma tryptophan (Trp), kynurenine (Kyn) and MT contents in sheep fed rumen protected tryptophan (RPTrp). Fifteen Suffolk sheep aged (3.0±0.5) years, with an average body weight (64.45±2.41) kg were divided into 3 groups (5 in each group): control group, trail group Ⅰ and trial group Ⅱ. All sheep were fed 12 g/kg BW of concentrate, 1.8 kg corn silage, 222.2 mg/kg BW of RPTrp and allowed free choice continuous access to mixed hay. On the basis of this, sheep of trail group Ⅰ and trial group Ⅱ were fed CF 50 and 100 mg per sheep per day, respectively. The results showed as follows: 1) there was no significant difference in plasma Trp and Kyn contents among groups during 0 to 12 h after feeding in the morning ($P>0.05$), but plasma Trp content in trial groups reduced at 6 and 8 h after feeding in the morning ($P$=0.087 2, $P$=0.053 1). Plasma Kyn content in the plasma of trial groups reduced too at 4.5, 6, 8 and 10 h after feeding in the morning ($P$=0.094 8, $P$=0.066 7, $P$=0.090 9, $P$=0.0542 ). 2) At 4.5 and 8 h after feeding in the morning, plasma 5-hydroxytryptamin (5-HT) content in trail groups increased compared with the control group ($P$=0.080 7, $P$=0.054 1). At 10 h, plasma 5-HT content in trail groups significantly increased ($P$=0.005 7). At 6 and 8 h after feeding in the morning, plasma MT content in trail groups also increased ($P$=0.089 0, $P$=0.070 4), and it was significantly higher at 10 h than that in

the control group ($P$=0.000 2). 3) Compared with the control group, the plasma total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity in trail group Ⅱ were significantly increased ($P<$ 0.05), malonaldehyde content was significantly decreased ($P < 0.05$), and total antioxidant capacity in trail group Ⅰ was also significantly improved ($P < 0.05$). In conclusion, the supplement of RPTrp (222.2 mg/kg BW) with 50 or 100 mg CF per sheep per day has the tendency of reducing plasma Kyn content from 4.5 to 10 h after feeding, but has no significant effect on plasma Trp, 5-HT, MT contents, but can improve the plasma oxidation capacity of sheep.

**Key words:** sheep; rumen protected tryptophan; calcium folate; kynurenine; melatonin

*Corresponding author, professor, E-mail: yangkailun2002@aliyun.com (责任编辑　陈　鑫)